

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08496

研究課題名(和文) 近赤外線レーザーを用いた心筋炎の非侵襲的治療法の探求

研究課題名(英文) Noninvasive imaging and photothermal treatment of myocarditis

研究代表者

小菅 寿徳 (Kosuge, Hisanori)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00376774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：造影検査や光温熱治療に有効性がみられる金ナノ粒子を効率的に炎症細胞に取り込ませることができれば、心筋炎の重症化が見られる前に診断・治療が可能になると考えられる。本研究では、心筋炎モデルマウスを金ナノ粒子投与後にマイクロCT装置にて撮影を行い、心筋に造影増強部位を確認した。また、同部位は病理組織学的検査にて炎症細胞の集積部位であることが確認された。金ナノ粒子を用いた心筋炎の非侵襲的な早期診断および治療への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、心筋炎の早期診断と治療を同時に可能とする技術の実現を目指し、金ナノ粒子を用いて心筋炎症部位のCTによる非侵襲的な描出の可能性を示した。CT装置は広く普及していて撮影は短時間で施行することができる利点がある。ナノ粒子を用いて重症化に至る前の初期段階でCT診断が可能となれば、早期の治療介入により心筋炎の重症化を防ぐことができ、予後の改善につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Gold nanoparticles are useful as computed tomography (CT) contrast agents and photothermal therapy and hence would be useful in diagnosis and treatment of myocarditis. In this study, we demonstrated gold nanoparticles were taken up by macrophages without cytotoxicity and accumulated in macrophages in the myocardium. Based on these experiments, gold nanoparticles show the potential for early diagnosis of myocarditis.

研究分野：循環器内科学

キーワード：ナノ粒子 心筋炎

1. 研究開始当初の背景

急性心筋炎は、細菌やウイルスの感染、免疫異常などにより発症する疾患で、多数の単核細胞浸潤、心筋細胞の断裂・融解・消失や間質の浮腫を認める。急性心筋炎の自然経過はいまなお明らかではないものの、心筋炎患者の多くは自然治癒が期待できる。一方、初期は軽度の症状を示すのみであっても急速に劇症化する症例も存在する。病状が日単位から、ときに時間単位で変化し、救命が困難となる場合がある。心電図・心臓超音波・心臓 MRI 検査は心筋炎診断に有用であるものの、自覚症状や徴候は非特異的であり、劇症化の予見は困難である。

ナノ粒子は炎症細胞を特異的に標的することができるため、ナノ粒子を用いた分子細胞イメージングにより炎症性疾患の進展について予見できる可能性がある。金ナノ粒子は CT 造影剤として利用でき、臨床で使用されているヨード造影剤よりも造影能が高いことが報告されている。また、金ナノ粒子は近赤外線レーザーを用いた photothermal therapy の適用の可能性があり、非侵襲的な治療への応用が期待される。

申請者は、マウス血管炎症モデルに対して、金ナノ粒子(GNP)を静注し、マイクロ CT を用いて経時的に撮影を行い、血管炎症部位に経時的な金ナノ粒子の集積を確認した。また、金ナノ粒子を取り込ませたマクロファージ細胞に近赤外線レーザーを照射し、照射後の細胞活性を検討したところ、金ナノ粒子を取り込ませたマクロファージ細胞は、金ナノ粒子を取り込ませていないマクロファージ細胞に比し、有意に細胞活性が低下することを確認した。これらの結果から金ナノ粒子は炎症病変の診断および治療に有用であることが示唆されたが、細胞照射に用いた近赤外線レーザーの強度が強く in vivo への応用に課題が残る結果であった。一方、近赤外線の波長に吸収域がある金ナノ粒子(NIR-GNPs)は、レーザー照射による効率的な温度上昇が期待される。またナノ粒子を内包可能なリン酸カルシウムナノ粒子や PLGA ナノ粒子を、簡便に合成する技術を有しており、NIR-GNPs を内包することにより、NIR-GNPs 単体よりも高効率で病変部に取り込まれ、病変診断や治療効果が向上することが期待されると考え、研究に着手することとなった。

2. 研究の目的

本研究では、NIR-GNPs を用いた心筋炎の非侵襲的診断および近赤外線レーザーによる病変進展抑制効果について検証するため、以下の項目について行うことを当初の目的とした。

- ◆ マクロファージ細胞内への GNPs の取り込みや毒性などを評価する。また、心筋炎モデルマウスを用いて GNPs の病変部への集積をマイクロ CT、病理組織学的検査にて評価する。
- ◆ 近赤外線レーザーを用いて、GNPs と共培養を行なったマクロファージ細胞の細胞死誘導について評価する。

3. 研究の方法

(1) GNP の細胞内取込、および毒性評価

マウスマクロファージ細胞(RAW264.7)と GNP および NIR-GNPs(2 種類)の共培養を行い、電子顕微鏡およびマイクロ CT を用いて細胞内への取込みを検証した。また細胞毒性を MTT assay により評価した。

(2)心筋炎モデルマウスによる GNP の取込み評価

7 週齢の野生型 BALB/c マウスに 0.2mg の Freund アジュバントでエマルジョン化した MHC ペプチドを皮下注射して心筋炎モデルマウスを準備した。

心筋炎モデルマウスに対して、GNP 静注前、および静注 48 時間後にマイクロ CT 撮影を行った。撮影後に心臓を摘出し、病理組織学的評価を行った。

4. 研究成果

(1) GNP の細胞内取込、および毒性評価

GNP および NIR-GNPs と共培養後のマクロファージ細胞を電子顕微鏡で観察したところ、いずれの金ナノ粒子もマクロファージ細胞内への取り込みが確認できた(図 1)。しかし、共培養を行ったマクロファージ細胞をマイクロ CT で撮影したところ、共培養したマクロファージ細胞の CT 値は 3 群共にマクロファージ細胞のみの CT 値と同等であった(図 2)。

GNP および NIR-GNPs いずれも共培養なしの細胞と比較し細胞活性の低下はなく、培養濃度においてはいずれの金ナノ粒子も細胞毒性を示さなかった。

GNP および NIR-GNPs の細胞毒性はみられなかったが、近赤外線レーザーを用いた細胞死を誘導するために十分な金ナノ粒子の取り込みが見られていないため、in vivo 実験では GNP を用いて行った。また研究の進行の遅れがあり NIR-GNPs の細胞内取込率の改善に関する検討が十分に行えず、研究目的 2 の検証に至らなかった。

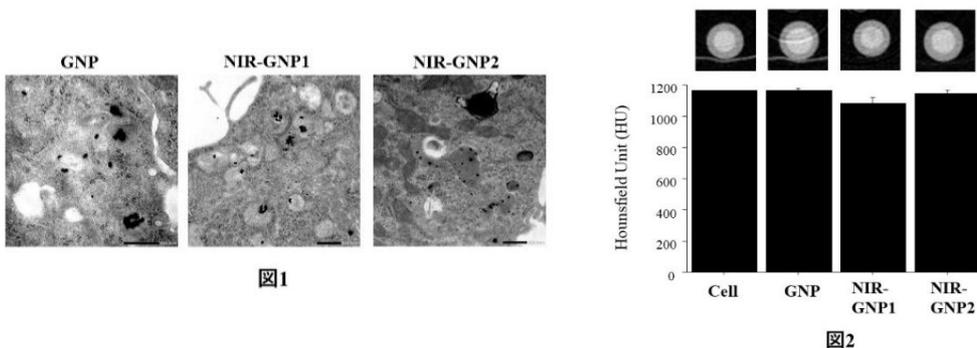


図1

図2

(2) 心筋炎モデルマウスによる GNP の取込み評価

正常マウスを心電同期下でマイクロ CT にて撮影を行った。リング状の artifact が見られたが、マイクロ CT イメージング用のヨード造影剤にて心血管の描出が可能であることを確認した (図 3)。引き続き自己免疫性心筋炎モデルマウスに対して GNP を静注しマイクロ CT 撮影を行った。静注後右室外膜側に造影増強効果が認められたが (図 4 : 矢印)、左室心筋内に明らかな造影効果は見られなかった。

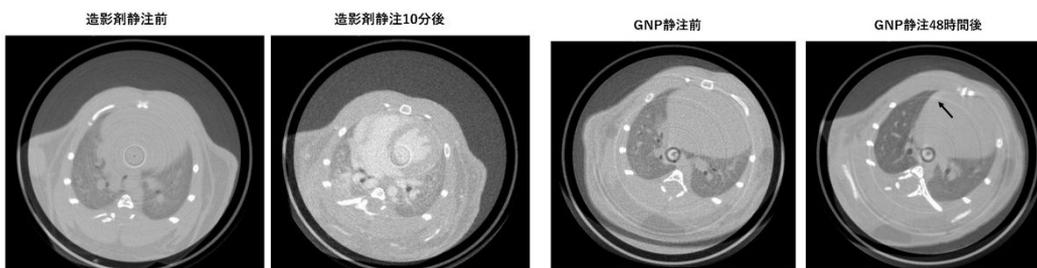


図3

図4

摘出した心臓の病理組織学的検討では、心筋内の線維化の進行を認めた (図 5 真中)。マイクロ CT 撮影で認められた右室外膜側の造影増強部位に一致して、マクロファージの浸潤が確認できた (図 5 右)。一方、左室心筋内への炎症細胞浸潤は少なかった (図 5 左)。左室心筋の電子顕微鏡による観察においてもマクロファージの数が少なく、金ナノ粒子の取り込みについての評価が困難であった (図 6)。撮影時点では心筋内の線維化の進行を認めたものの炎症細胞の浸潤が少なかったため、心筋内炎症細胞への GNP 取込みを評価するために心筋炎誘発後から経時的な CT 撮影が必要であると考えられた。

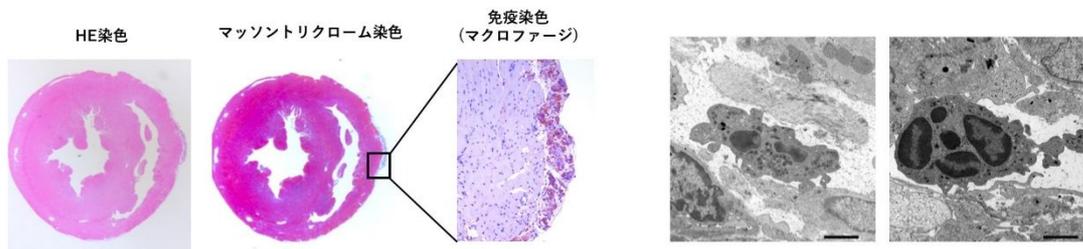


図5

図6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Maki, Oyane Ayako, Kuroiwa Kiyoko, Kosuge Hisanori	4. 巻 194
2. 論文標題 Fabrication of gold-calcium phosphate composite nanoparticles through coprecipitation mediated by amino-terminated polyethylene glycol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111169 ~ 111169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfb.2020.111169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosuge Hisanori, Nakamura Maki, Oyane Ayako, Tajiri Kazuko, Murakoshi Nobuyuki, Sakai Satoshi, Sato Akira, Taninaka Atsushi, Chikamori Taishiro, Shigekawa Hidemi, Aonuma Kazutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Potential of Gold Nanoparticles for Noninvasive Imaging and Therapy for Vascular Inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Imaging and Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11307-021-01654-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hisanori Kosuge, Maki Nakamura, Ayako Oyane, Atsushi Taninaka, Hidemi Shigekawa, Taishiro Chikamori, Kazutaka Aonuma
2. 発表標題 Potential of Targeted Nanotherapy for Vascular Inflammation With Gold Nanoparticles
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 真紀、大矢根 綾子、黒岩 輝代子、小菅 寿徳、青沼 和隆
2. 発表標題 動脈硬化の早期発見を目指した磁性酸化鉄-リン酸カルシウム複合ナノ粒子の開発
3. 学会等名 日本セラミックス協会2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村真紀、黒岩輝代子、大矢根綾子、小菅寿徳
2. 発表標題 ポリエチレングリコールで被覆された金ナノ粒子とリン酸カルシウムの相互作用
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村真紀、黒岩輝代子、大矢根綾子、小菅寿徳
2. 発表標題 動脈硬化の診断に向けたリン酸カルシウム複合ナノ粒子の開発
3. 学会等名 日本セラミックス協会2020年年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	前嶋 康浩 (Maejima Yasuhiro) (40401393)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------